

На правах рукописи

**МИХАЙЛОВА ЕКАТЕРИНА ОЛЕГОВНА**

**СУБТИЛИЗИНОПОДОБНАЯ ПРОТЕИНАЗА *BACILLUS*  
*INTERMEDIUS*, СЕКРЕТИРУЕМАЯ РЕКОМБИНАНТНЫМ  
ШТАММОМ *BACILLUS SUBTILIS* НА РАЗНЫХ ФАЗАХ РОСТА**

03.00.07 – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2007

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии биолого-почвенного факультета ГОУ ВПО «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина».

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор  
Шарипова Маргарита Рашидовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник  
лаборатории биохимии РЦПБ СПИД  
Коксин Владимир Петрович

кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Казанского института биохимии  
и биофизики РАН  
Давыдова Марина Николаевна

Ведущая организация: Институт биологии УНЦ РАН, г. Уфа

Защита диссертации состоится «25» октября 2007 г. в часов на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание, ауд. .

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета

Автореферат разослан « » сентября 2007 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



З.И. Абрамова

**Актуальность проблемы.** Субтилизиноподобные сериновые протеазы – группа протеолитических ферментов, которые обнаружены на всех ступенях эволюционной лестницы: вирусах, бактериях, археях, грибах и высших эукариотах [Rawlings, Barrett, 1994]. Несмотря на высокую степень филогенетической удаленности организмов, синтезируемые ими протеиназы имеют немало общего в строении и функциях, что позволяет сделать заключение об эволюционном родстве этих ферментов. Для многих субтилаз известна третичная структура [Siezen, Leunissen, 1997]. Распространенность субтилаз в природе свидетельствует о том, что они являются жизненно-важными ферментами. Разнообразие этих белков находит отражение в функционировании субтилаз. Круг процессов, в которые вовлечены эти ферменты, обширен благодаря отсутствию узкой специфичности, сохранению каталитической активности в широких пределах pH и температур, а также различной клеточной локализации. Доказано их участие в процессах эмбриогенеза эукариот, а также в различных патологических состояниях: от болезни Альцгеймера и рака до лихорадки Эбола и ВИЧ [Thomas, 2002; Henrich et al., 2003]. Современная наука располагает данными более чем о 550 прокариотических субтилизиноподобных протеиназ, их число постоянно растет [Siezen et al., 2007]. В клетках прокариот они участвуют в разнообразных физиологических процессах, включая клеточную дифференцировку. Тем не менее, сведения о механизмах вовлечения протеаз в различные процессы, и, в частности, в формирование клеточного ответа в стационарной фазе роста, ограничены. Дальнейшие исследования в этой области будут способствовать пониманию молекулярных механизмов участия этих ферментов в реакциях адаптации микроорганизмов к меняющимся условиям среды.

Ранее показано, что бактерии *Bacillus intermedius* секретируют различные протеиназы, среди которых доминирует субтилизиноподобная сериновая протеиназа (AprBi); ее доля составляет до 80% от пула внеклеточных протеиназ, выделяемых этими бактериями в среду [Шарипова с соавт., 2000]. Ген субтилизиноподобной протеиназы клонирован в мульткопийную плазмиду pCS9, его экспрессия изучена в рекомбинантном штамме *Bacillus subtilis* [Sharipova et al., 2007]. Показано, что накопление фермента *Bacillus intermedius* в культуральной жидкости рекомбинантного штамма достигает максимального значения на 28 ч (ранняя протеиназа) и 48 ч (поздняя протеиназа) роста. Установлено, что в процессе роста культуры происходит смена механизмов регуляции экспрессии гена протеиназы.

**Целью** работы явились выделение и характеристика субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* в ранней и поздней стационарной фазе роста.

**Основные задачи исследования:**

1. Подбор условий культивирования для выделения протеиназы *Bacillus intermedius* из рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* на

- ранней (ранняя протеиназа) и поздней (поздняя протеиназа) стационарной фазе роста культуры.
2. Очистка субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* на ранней и поздней стационарной фазе роста культуры.
  3. MALDI-TOF и BLAST анализ аминокислотных последовательностей протеиназы ранней и поздней стационарной фазы роста.
  4. Исследование физико-химических свойств субтилизиноподобной протеиназы, соответствующей разным стадиям роста рекомбинантного штамма.
  5. Выяснение роли ионов кальция в стабилизации структуры протеиназы, соответствующей разным стадиям культивирования рекомбинантных бактерий.

**Научная новизна.** Впервые выделена и охарактеризована внеклеточная субтилизиноподобная протеиназа *B. intermedius*, соответствующая разным стадиям роста рекомбинантного штамма *B. subtilis*. Проведена сравнительная характеристика свойств протеиназы, секретируемой бациллами в начале и конце стационарной фазы. Установлено, что, обладая идентичной аминокислотной последовательностью, ферменты различаются по каталитическим свойствам. Получены приоритетные данные о способности протеиназы, секретируемой в позднюю стационарную фазу, образовывать димеры. Предполагается, что ведущая роль в формировании димеров принадлежит ионам кальция в кальций-связывающих центрах на поверхности белковой глобулы. На основании аминокислотной последовательности протеиназы предложена модель третичной структуры.

**Практическая значимость.** Подобраны условия культивирования бактерий для эффективной продукции фермента, секретируемого на ранней и поздней стационарной фазе роста и разработаны условия очистки этих ферментов. Результаты могут быть использованы при разработке стратегии синтеза ферментов промышленными штаммами бактерий. Получение гомогенных препаратов ферментов увеличивает арсенал белков, используемых в научных исследованиях и в практических целях. Данные по стабильности белка открывают возможность применения протеиназы AprVi в качестве добавок к различным детергентам, фармацевтике и в генноинженерных исследованиях.

**Связь работы с научными программами.** Работа проводилась в соответствии с планом НИР КГУ (№ гос. регистрации 01.2.00 104982 «Биосинтез, биогенез, классификация, физиологические функции новых микробных ферментов и возможные области их практического применения»). Исследования поддержаны грантами РФФИ 05-04-48182-а, Академии наук РТ № 03-3.5-20 и Аналитической Ведомственной Целевой Федеральной Программы РНП 2.11.1005. Все результаты, представленные в работе, получены лично автором.

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Выделена и охарактеризована субтилизиноподобная сериновая протеиназа *Bacillus intermedius* рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis*, секретируемая в раннюю и позднюю стационарную фазу роста.
2. Ранняя и поздняя протеиназы рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* имеют идентичную аминокислотную последовательность и близкие энзиматические свойства, но отличаются по каталитическим характеристикам.
3. Поздняя протеиназа *Bacillus subtilis*, в отличие от ранней, образует димеры, в формировании которых участвуют ионы кальция.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных, всероссийских и региональных конференциях: "Материалы и технологии XXI века" (Казань, 2005-2007), школах-конференциях молодых ученых "Биология – наука XXI века" (Пущино, 2005, 2006), Всероссийской научной конференции "Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии" (Казань, 2004), Всероссийской научной конференции "Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение" (Казань, 2005), V республиканской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Наука. Инновации. Бизнес» (Казань, 2005), Международной конференции аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», (Москва, 2005-2007), Материалах XLIII международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» секция биология (Новосибирск, 2005), BGRS-2006: Proceedings of the fifth international conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (Novosibirsk, 2006), VI симпозиуме «Химия протеолитических ферментов» (Москва, 2007).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 19 научных работ.

**Место выполнения работы и благодарности.** Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского государственного университета. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н., проф. М.Р. Шариповой за внимательное отношение к работе; д.х.н., проф. Г.Н. Руденской за возможность проведения экспериментов по изучению свойств ферментов на базе лаборатории кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ; к.б.н., с.н.с. Н.П. Балабан и к.б.н., доц. А.М. Мардановой за постоянную помощь в проведении экспериментов; д.б.н., проф. С.В. Кострову (ИМГ РАН) за предоставление плазмиды pCS9; профессору Ю. Йомантасу (ГНИИ Генетика и Селекция Промышленных микроорганизмов) за предоставление протеазо-дефицитного штамма *B. subtilis* AJ73; к.б.н. с.н.с. И.В. Демидюку (ИМГ РАН) за консультацию при проведении экспериментов по изучению механизма формирования димеров.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований и обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 166 страницах машинописного

текста, включает 10 таблиц, 21 рисунок. Библиография содержит 293 наименования российских и зарубежных авторов.

### **Материалы и методы**

**Объект исследования.** Объектом исследования служил рекомбинантный штамм *B. subtilis* AJ73(pCS9). Он получен путем трансформации плазмиды pCS9 в протеазо-дефицитный штамм *B. subtilis*, из хромосомы которого делетированы гены внеклеточных протеиназ (штамм любезно предоставлен проф. Ю. Йомантасом, ГНИИ Генетики и Селекции Промышленных микроорганизмов, Москва). В работе использована мультикопийная плазмида pCS9, любезно предоставленная для исследований проф. С.В. Костровым, ИМГ РАН, Москва. Плазмида сконструирована на основе вектора pCB22 [Sorokin et al., 1990] и несет полный ген субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B. intermedius* под собственным промотором.

**Культивирование бактерий.** Исходной питательной средой для культивирования рекомбинантных бактерий являлась пептон-содержащая среда [Ицкович с соавт., 1995]. Для подбора оптимальной среды использовали коллагин («Биопрогресс», Россия) в концентрации 1 и 2% в качестве добавки к пептон-содержащей среде. Кроме того, производили замену пептона («Sigma») на ферментативный пептон («Диа-М») в концентрациях 10-30 г/л. В среду культивирования непосредственно перед посевом добавляли эритромицин в концентрации 20 мкг/мл. Растворы неорганического фосфата ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) стерилизовали при 1 атм и вносили в среду перед посевом в концентрациях 0,1-0,4 г/л.

Прирост биомассы измеряли нефелометрически на КФК-2 при 590 нм. Протеолитическую активность определяли по гидролизу синтетического субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNA [Люблинская с соавт., 1987], азоказеина и казеина [Каверзнева, 1971]. Удельную активность выражали в ед/мг белка.

**Выделение и очистку протеиназы** из культуральной жидкости проводили методом ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и колонке MonoS в системе FPLC («Pharmacia», Швеция).

Степень чистоты полученных белковых препаратов и их молекулярную массу определяли электрофоретически. Электрофорез проводили в денатурирующих условиях по методу Лаэммли [Laemmli, 1970] и в нативных условиях в 10% ПААГ, как описано на сайте ([http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols/PAGE\\_Acidic.html](http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols/PAGE_Acidic.html)).

Гомогенные препараты белка, секретируемые на разных стадиях роста культуры, анализировали с помощью метода масс-спектрометрии (MALDI-TOF). Полученные данные обрабатывали с помощью программ Peptide Mass Fingerprint (<http://www.matrixscience.com>) и Peptide Mass (<http://cn.expasy.org>).

**Свойства ферментов.** Влияние ингибиторов на активность протеиназ определяли, используя PMSF, DTT, пХМБ, бензамидин, ЭДТА в соотношении 1:1000, овомукоид, ингибитор из морской анемоны, ингибитор трипсина и *o*-фенантролин в молярном соотношении фермент: ингибитор 1:10.

Субстратную специфичность полученных ферментов определяли по гидролизу синтетических *n*-нитроанилидных субстратов Glp-Ala-Ala-Leu-pNa, Glp-Phe-Ala-Ala-pNa, Z-Ala-Ala-Val-pNa, Glp-Phe-Gly-pNa, Z-Ala-Ala-Leu-pNa и Z-Glu-pNa. Специфичность протеиназ на природных субстратах изучали по действию на В-цепь окисленного инсулина овцы как описано в работе [Ицкович с соавт., 1997].

$K_m$  и  $k_{кат}$  препаратов протеиназ определяли по гидролизу специфического хромогенного субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa с использованием двулучевого спектрофотометра Lambda 35 «Perkin Elmer» (США).

pH- и T-оптимум, pH- и T-стабильность протеиназ исследовали по гидролизу синтетического хромогенного субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa с использованием Трис-HCl-буфера и универсального буфера, в состав которого входили 0,04 М растворы CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> и H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH доводили 0,2 М NaOH.

Влияние ионов двухвалентных металлов на активность протеиназ изучали после инкубации растворов белков в Трис-HCl буфере, содержащем Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> в концентрации от 5 до 20 мМ.

Гель-фильтрацию ферментных растворов проводили на колонке с сефадексом G-100 (Pharmacia, Sweden). Диализ белковых растворов для удаления ионов Ca<sup>2+</sup> проводили против Трис-HCl буфера, содержащего 1% ЭДТА.

Выравнивание аминокислотной последовательности протеиназы AprBi с последовательностями классических субтилизинов, а также построение филогенетического древа проведено с помощью программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Модель третичной структуры построена на основании аминокислотной последовательности протеиназы AprBi из рекомбинантного штамма в программах SwissProt ([www.au.expasy.org/spdbv](http://www.au.expasy.org/spdbv)) и YASARA ([www.yasara.org](http://www.yasara.org)).

Математическую обработку полученных данных проводили в программной среде «Microsoft Excel». Результаты многофакторных экспериментов обрабатывали с помощью программы STATGRAPHICS.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Подбор состава питательных сред для эффективной продукции протеиназы *B. intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis*

Бациллы продуцируют различные внеклеточные ферменты в период пост-экспоненциальной и стационарной фаз роста. Секреция субтилизиноподобных протеиназ сильно зависит от компонентов питательной среды, а именно от соотношения в среде источников азота и углерода, присутствия легко метаболизируемых сахаров (например, глюкозы), ионов металлов и т.д. [Varela et al., 1996; Beg et al., 2002]. Использование сред, содержащих сложные органические соединения (пептон, триптон, дрожжевой экстракт) приводит к более интенсивному росту и

продукции внеклеточных протеиназ бактерий [Сафонова с соавт., 1999]. Обогащенность сред физиологически активными соединениями, микроэлементами и другими факторами роста благоприятно сказывается на жизнедеятельности и биосинтетической активности микроорганизмов. Для культивирования рекомбинантного штамма мы использовали пептон-содержащие среды.

Таблица 1. Питательная среда для максимальной продукции субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis*

Состав питательной среды (основные источники азота)				Активность, ед/мг	
№	Бактериологический пептон	Колламин	Ферментативный пептон	Ранняя протеиназа	Поздняя протеиназа
1	20 г/л	-	-	0,54	1,24
2	20 г/л	1%	-	0,23	0,5
3	20 г/л	2%	-	0,13	0,3
4	-	1%	-	0,27	0,61
5	-	2%	-	0,35	0,64
6	-	-	20 г/л	0,38	0,7
7	-	-	30 г/л	0,4	0,73
8	-	-	40 г/л	0,42	0,76

Солевая основа среды (%):  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,06,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,05,  $\text{NaCl}$  – 0,3,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 0,02,  $\text{MnSO}_4$  – 0,01,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0,035, pH – 8,5.

Накопление протеиназы *B. intermedius* в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* начинается в фазе замедления роста, достигает максимального значения на 28 и 48 ч роста и зависит от состава питательной среды. С целью достижения эффективной продукции протеиназы, соответствующей ранней и поздней стационарной фазе роста, проводили подбор питательной среды. Для этого варьировали концентрации различных источников азота в среде культивирования. Наряду с бактериальным пептоном (20 г/л) использовали колламин (1 и 2%) и ферментативный пептон (20-40 г/л) в качестве более дешевых замен пептона в условиях масштабирования процесса очистки. Максимальный уровень активности субтилизиноподобной протеиназы в культуральной жидкости отмечен для среды, содержащей бактериальный пептон (табл. 1): активность ранней протеиназы в пептон-содержащей среде составила – 0,54 ед/мг, поздней протеиназы – 1,24 ед/мг. Замена пептона на колламин, а также внесение последнего в качестве дополнительного источника питания снижали активность протеиназы, более чем в 2 раза (0,23-0,35 ед/мг – для ранней протеиназы, 0,5-0,64 ед/мг – для поздней протеиназы). Использование ферментативного пептона в концентрациях 20-40 г/л вместо



бактериологического пептона приводило к снижению активности субтилизиноподобной протеиназы, но в меньшей степени, чем при использовании коллагена (0,38-0,42 ед/мг – для ранней протеиназы, 0,7-0,76 ед/мг – для поздней протеиназы). По-видимому, это связано с компонентным составом коллагена и ферментативного пептона, и, в частности, с набором аминокислот и пептидов, которые могут репрессировать накопление фермента в среде, либо ингибировать его активность. Полученные данные свидетельствовали в пользу использования для дальнейшей работы бактериологического пептона в качестве источника азота.

Оптимальное соотношение концентраций двух основных компонентов питательной среды – пептона и неорганического фосфата для эффективной продукции фермента подбирали в многофакторных экспериментах с последующей обработкой результатов в программе STATGRAFICS.

Максимальная активность ранней субтилизиноподобной протеиназы наблюдается при концентрации в среде пептона 30 г/л и неорганического фосфата 0,25 г/л, поздней протеиназы – при концентрации в среде пептона 30 г/л и неорганического фосфата 0,34 г/л (рис. 1). Таким образом, количество пептона, необходимое для максимальной продукции субтилизиноподобной протеиназы, соответствующей разным часам роста, идентично, в то время как количество неорганического фосфата, различно. Полученные результаты позволили разработать оптимальные питательные среды для продукции фермента с целью его выделения.

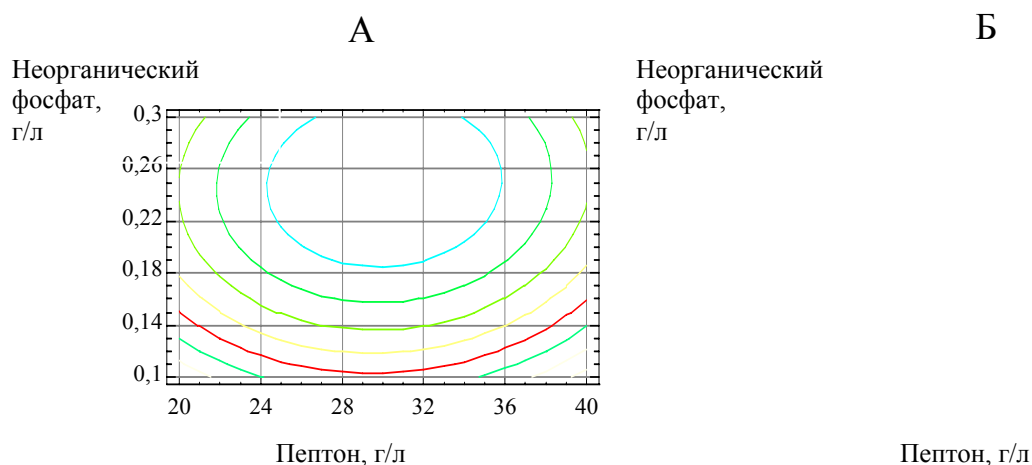


Рис. 1. Линии уровня активности ранней (А) и поздней (Б) протеиназы рекомбинантного штамма *B. subtilis* в двухфакторных экспериментах

### Выделение и очистка субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius*

Субтилизиноподобная протеиназа *B. intermedius*, секретируемая рекомбинантным штаммом *B. subtilis*, была выделена с помощью ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе, высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке MonoS в системе FPLC и рехроматографии белков на колонке MonoS. В результате получены два

препарата субтилизиноподобной протеиназы, секретируемой на 28 (протеиназа ранней стационарной фазы) и 48 ч (протеиназа поздней стационарной фазы) роста. Степень очистки ранней протеиназы составила 711, поздней протеиназы – 745. Выход по активности – 9,6% и 16,4%, соответственно. Гомогенность полученных препаратов фермента подтверждена электрофоретически (рис. 2). Молекулярная масса ранней и поздней протеиназ была идентична и составила 27 кДа.

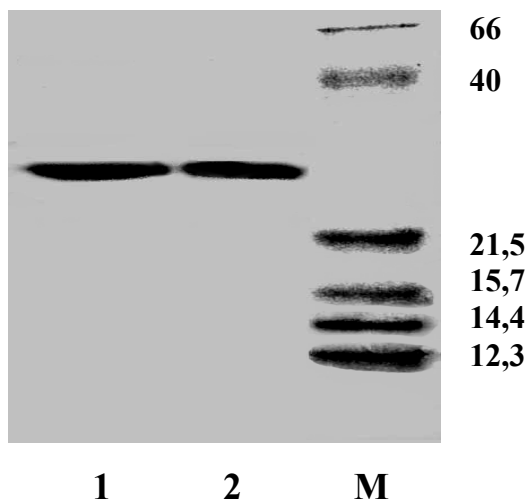


Рис. 2. Электрофорез в SDS-ПААГ препаратов сериновой протеиназы *B. intermedius*, секретируемой *B. subtilis*. М – Маркеры: РНКаза (Биназа) (12,3 кДа), лизоцим (14,4 кДа), РНКаза А (15,7 кДа), ингибитор трипсина (21,5 кДа), пероксидаза (40 кДа), БСА (66 кДа).  
1 – ранняя протеиназа; 2 – поздняя протеиназа.

Препараты белка, соответствующие разным часам стационарной фазы роста культуры, проанализированы нами с помощью метода MALDI-TOF-спектрометрии. Метод позволяет установить структуру аминокислотной последовательности и молекулярную массу исследуемого белка. Результаты, полученные с помощью MALDI-TOF спектрометрии, были обработаны в программных средах Peptide Mass Fingerprint и Peptide Mass ([www.exPASy.org](http://www.exPASy.org)). Нами установлена первичная структура белка, секретируемого рекомбинантным штаммом *B. subtilis* на ранней и поздней стационарной фазе роста (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют, что протеиназы рекомбинантного штамма, соответствующие разным фазам роста, имеют идентичную последовательность аминокислот, начинаются с одной и той же аминокислоты и их N- и С-концевые последовательности совпадают. Рассчитанная на основе полученной последовательности молекулярная масса препаратов фермента составила 27 кДа. Таким образом, аминокислотная последовательность, полученная методом MALDI-TOF идентична последовательности белка, конвертированного из последовательности секвенированного гена *aprVi* (AY754946). Закономерно, что в последовательности протеиназы *AprVi* отсутствует цистеин, тремя консервативными аминокислотными остатками сформирована

каталитическая триада активного центра: D32, H64, S221. Положение аминокислот в области активного центра консервативно и соответствует положению таковых для других ферментов, относящихся к семейству субтилизинов [Siezen, Leunissen, 1997].

```

Ранняя протеиназа      GIPQIKAPAVHAQGYKGANVKVAVLDTGIHAAHPDLNVAGGASFVPSEPNATQD 60
Поздняя протеиназа     GIPQIKAPAVHAQGYKGANVKVAVLDTGIHAAHPDLNVAGGASFVPSEPNATQD 60

FQSHTGTHVAGTIAALDNTIGVLGVAPSASLYAVKVLDNRNGDQYSWIISGIEWAVANNMD 120
FQSHTGTHVAGTIAALDNTIGVLGVAPSASLYAVKVLDNRNGDQYSWIISGIEWAVANNMD 120

VINMSLGGPNGSTALKNAVDTANNRGVWVWAAAAGNSGSTGSTSTVGYPAKYDSTIAVANV 180
VINMSLGGPNGSTALKNAVDTANNRGVWVWAAAAGNSGSTGSTSTVGYPAKYDSTIAVANV 180

NSSNVRNSSSSAGPELDVSAPGTSILSTVPSSGYTSYTGTSMASPHVAGAAALILSKNPN 240
NSSNVRNSSSSAGPELDVSAPGTSILSTVPSSGYTSYTGTSMASPHVAGAAALILSKNPN 240

LSNSQVRQRLNTATPLGNSFYYGKGLINAQAASN 275
LSNSQVRQRLNTATPLGNSFYYGKGLINAQAASN 275

```

Рис. 3. Аминокислотная последовательность протеиназы AprBi, полученная с помощью MALDI-TOF анализа

С использованием программы BLAST Tree View Widget на основе аминокислотной последовательности субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* мы построили филогенетическое древо (рис. 4). На рисунке видно, что протеиназа AprBi располагается на одной ветви с другими бациллярными субтилизинами, которые выделены из аэробных спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus*. Несмотря на то, что эти микроорганизмы населяют разные экологические ниши: *B. intermedius* и *B. subtilis* – типичные почвенные микроорганизмы, *B. pumilus* – выделены из морской воды и соевых продуктов, а *B. subtilis. subsp. natto* - из соевого сыра, секретлируемые ими субтилизиноподобные протеазы имеют консервативную структуру. Построение эволюционного древа на основе варибельности структуры субтилизиноподобных протеиназ выявило интересные особенности филогенеза протеиназы AprBi. Субтилизиноподобная протеиназа *B. intermedius* и субтилизиноподобная протеаза BPP-A представляют собой отдельную ветвь эволюции субтилизиноподобных протеаз. Известно, что субтилизиноподобная протеаза *B. pumilus*, также как протеиназа AprBi, обладает широкой субстратной специфичностью и активна при высоких значениях pH [Kumar, 2002; Huang et al., 2003; Miyaji et al., 2006]. Другие родственные ферменты, и субтилизин AP01, и наттокиназа находятся на других ветвях эволюционного древа этих ферментов. Полученная картина

эволюции данных ферментов показывает, что все они произошли от одного общего древнего предка (рис. 4).

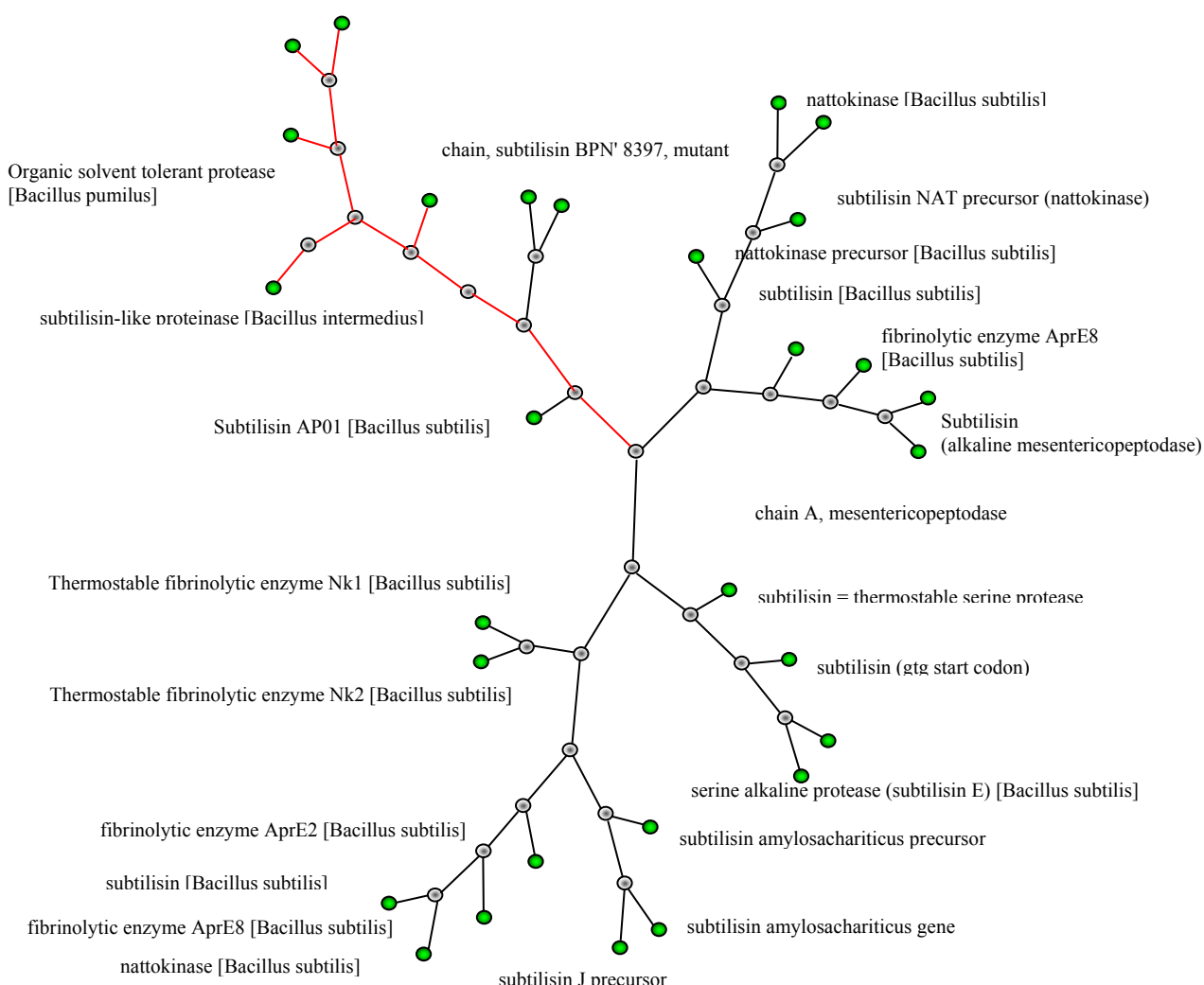


Рис.4. Филогенетическое дерево субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* 3-19

### Характеристика протеиназы рекомбинантного штамма *B. subtilis*

Активность обоих препаратов фермента полностью подавлялась специфическим ингибитором PMSF, фермент нечувствителен к ингибиторам металлопротеаз и белковым ингибиторам (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют об их принадлежности к семейству сериновых протеиназ.

Изучение субстратной специфичности протеиназы ранней и поздней стационарной фазы роста выявило различия в расщеплении ими синтетических пептидных и белковых субстратов (табл. 3). Оба фермента не способны гидролизовать субстраты, специфичные для химотрипсина (Glp-Phe-Gly-pNa) и Glu-Asp-специфичных протеаз (Z-Glu-pNa). Максимальная активность ранней и поздней протеиназы в отношении субстратов, специфичных для субтилизинов (Glp-Ala-Ala-Leu-pNa и Z-Ala-Ala-Leu-pNa), подтверждает принадлежность протеиназы к клану субтилаз.

Таблица 2. Влияние ингибиторов на активность субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius*, секретируемых рекомбинантным штаммом

Ингибитор	Ранняя протеиназа, активность, %	Поздняя протеиназа, активность, %
PMSF	0	0
DTT	100	100
ЭДТА	100	100
Бензамидин	100	100
пХМБ	100	100
<i>o</i> -фенантролин	100	100
Овомукоид	100	100
ингибитор трипсина	100	100
ингибитор из морской анемоны	100	100

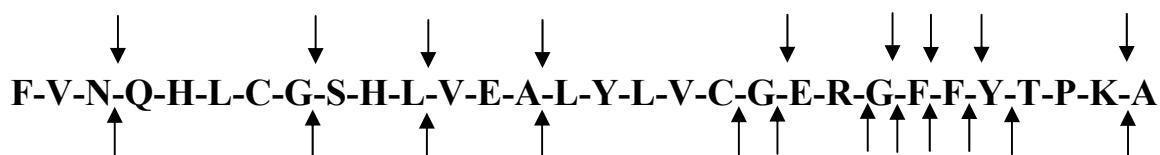
Таблица 3. Субстратная специфичность протеиназы AprBi

субстрат	ранняя протеиназа, ед/мг	поздняя протеиназа, ед/мг
Glp-Ala-Ala-Leu-pNa	105,6±1,58	138,7±2,08
Glp-Ala-Ala-Phe-pNa	1,0±0,02	1,6±0,02
Z-Ala-Ala-Val-pNa	0	0
Glp-Phe-Gly-pNa	0	0
Z-Ala-Ala-Leu-pNa	102,0±1,53	121,7±1,83
Z-Glu-pNa	0	0
Казеин	250,1±3,75	301,4±4,5
Азоказеин	300,7±4,51	354,6±5,32

Большинство субтилизинов бактерий, например, субтилизин BPN', савиназа, эспераза, предпочитают гидролизовать связи, образованные ароматическими (Phe) и алифатическими (Leu) аминокислотами. Протеиназа AprBi наиболее эффективно гидролизовала *n*-нитроанилиды, содержащие гидрофобные аминокислоты: лейцин и фенилаланин. Однако удельная активность протеиназы ранней и поздней стационарной фазы на этих субстратах различалась. Данные по удельной активности белков свидетельствуют в пользу более высокого сродства по отношению к этим субстратам поздней протеиназы. Аналогичные результаты получены для белковых субстратов – казеина и азоказеина, которые эффективнее расщепляются более поздним ферментом. Таким образом, поздняя протеиназа более эффективно расщепляет синтетические и природные субстраты.

Гидролиз В-цепи субтилизиноподобной протеиназой *B. intermedius* из рекомбинантного штамма, соответствующей разным фазам роста, приводил к появлению многочисленных пептидных фрагментов, что указывает на широкую субстратную специфичность фермента. Ранняя и поздняя протеиназы активно гидролизуют связи, образованные карбоксильными группами гидрофобных аминокислот (Leu11-Val12, Phe25-Tyr26 и т. д.), а также гидрофильных аминокислот, включая кислые и основные (Gly8-Ser9, Gln4-His5 и т.д.) (рис. 5). Однако существуют различия в протеолитической активности субтилизиноподобной протеиназы: поздняя протеиназа при равных условиях гидролизует субстрат более эффективно, а именно расщепляет две дополнительные связи в цепи В-инсулина (Cys19-Gly20 и Tyr26-Tre27).

Ранняя протеиназа *B. intermedius* (*B. subtilis* AJ73)



Поздняя протеиназа *B. intermedius* (*B. subtilis* AJ73)

Рис. 5. Гидролиз В-цепи инсулина субтилизиноподобной протеиназой *B. intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis*

Более высокая протеолитическая активность поздней протеиназы в отношении белковых и синтетических субстратов может быть связана с функцией этого фермента в клетке. Предполагается, что ранняя протеиназа играет регуляторную роль на этапе инициации споруляции. Поздняя протеиназа соответствует VI стадии споруляции и участвует в апоптозо-подобных реакциях, в частности в расщеплении белков материнской клетки, способствуя освобождению эндоспор в среду [Шарипова с соавт., 2002].

Исследование кинетических параметров показало, что значение  $K_m$  для ранней протеиназы (1,85 мМ) более чем в 2 раза превышало значение  $K_m$  для поздней протеиназы (0,86 мМ). Из этого следует, что поздняя протеиназа обладает большим сродством к субстрату Z-Ala-Ala-Leu-pNa, чем ранняя протеиназа. Эффективность катализа поздней протеиназы значительно выше, чем ранней так как значение  $k_{kat}$  (5574 с<sup>-1</sup>) поздней протеиназы выше, чем  $k_{kat}$  (4748 с<sup>-1</sup>) ранней протеиназы.

Субтилазы весьма устойчивы в широких пределах температур. Нами установлено, что температурный оптимум для раннего фермента равен 37°C, а для позднего – 45°C (табл. 4). Эти значения ниже, чем для других субтилизинов мезофильных бактерий – субтилизинов BPN' и Carlsberg, температурный оптимум которых равен 60°C.

Таблица 4. Энзиматические свойства субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* рекомбинантного штамма *B. subtilis*

Свойства	Ранняя протеиназа	Поздняя протеиназа
Т-оптимум	37°C	45°C
Термостабильность	0–50°C	0–55°C
рН-оптимум		
Трис-НСl буфер	9,5	9,5
Универсальный буфер	11,0	11,0
рН-стабильность		
Трис-НСl буфер	7,0–10,0	7,0–10,0
Универсальный буфер	7,5–11,5	7,5–11,5

Стабильность ферментов имеет важное значение при их работе в живых системах и при использовании в промышленных целях. Для обоих препаратов фермента характерно сохранение активности в широком интервале температур: ранней протеиназы от 0–50°C, поздней протеиназы – от 0–55°C (табл. 4). Увеличение интервала термостабильности для поздней протеиназы, по-видимому, представляет собой адапторный механизм устойчивости при неблагоприятных воздействиях окружающей среды.

Интересно, что обе протеиназы стабильны при температурах ниже 30°C. Оба фермента сохраняют до 40% активности при температуре +5°C. При +15°C поздняя протеиназа сохраняла до 80% активности. Подобная картина характерна для субтилизинов психрофильных бактерий [Kulakova et al., 1999; Wang et al., 2005]. Устойчивость протеиназы AprVi при низких температурах открывает возможности ее практического применения.

Субтилизиноподобные протеазы – щелочные ферменты, они активны при высоких значениях рН. Рекомбинантная протеиназа AprVi не является исключением. Значение рН-оптимума для протеиназы рекомбинантного штамма *B. subtilis*, в универсальном буфере равно 11, в Трис-НСl-буфере – 9,5 (табл. 4). Оба фермента в универсальном буфере сохраняли стабильность в интервале рН 7,5–11,5, в Трис-НСl-буфере – 7–10. Таким образом, протеиназа AprVi входит в число высокощелочных субтилизинов, что также может иметь практическое значение.

Стабилизация белковой глобулы субтилизиноподобных протеиназ происходит за счет ионов кальция [Siezen, Leunissen, 1997]. В присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  наблюдалось повышение активности обоих препаратов протеиназы. Показано, что ионы других металлов также способны влиять на активность разных субтилаз. Нами установлено, что ионы двухвалентных металлов оказывают различное влияние на активность ранней и поздней протеиназы (рис. 6). Максимальный ингибирующий эффект обнаружен для ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в концентрации 20 мМ, которые снижали активность поздней протеиназы более чем на 70%, а активность ранней протеиназы только на 40%. В присутствии ионов  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$  в концентрации 5 мМ активность обоих

белков снижалась незначительно (на 10%). Ионы  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$  в концентрации 10 мМ ингибировали активность ранней и поздней протеиназ на 20%, а в концентрации 20 мМ – понижали активность ранней протеиназы на 35-40%. Аналогичные результаты получены для ионов  $\text{Ni}^{2+}$  в концентрации 10 и 20 мМ. Низкие концентрации  $\text{Mn}^{2+}$  (5 мМ) не оказывали влияния на активность ранней протеиназы и снижали активность поздней протеиназы на 15%. Активность поздней протеиназы при увеличении концентрации ионов  $\text{Mn}^{2+}$  до 20 мМ снижалась на 50%, в то время как активность ранней протеиназы только на 30%. Проведенные нами исследования по влиянию ионов  $\text{Mg}^{2+}$  показали, что активность обоих ферментов практически не снижалась в присутствии 5 мМ  $\text{Mg}^{2+}$ . 10 и 20 мМ  $\text{Mg}^{2+}$  ингибировали активность ранней протеиназы на 20 и 40%, соответственно, в то время как ингибирование активности поздней протеиназы ионами  $\text{Mg}^{2+}$  наблюдалось только при концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  20 мМ (на 30%). Активация ионами  $\text{Ca}^{2+}$  известна в отношении многих субтилизинов [Betzel et al., 1988; Siezen et al., 1991]. Нами показано, что ионы кальция активировали раннюю и позднюю протеиназу, но в разной степени: активность позднего фермента увеличивалась на 70%, тогда как активность раннего фермента – только на 15-20%. Различное влияние ионов двухвалентных металлов на активность фермента, возможно, связано с особенностями в структуре белка. Стабилизация поздней протеиназы в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ , может быть обусловлена тем, что в поздней стационарной фазе роста необходима такая упаковка белковой глобулы, которая обеспечивала бы максимальную стабильность фермента и защищала бы от воздействия неблагоприятных факторов среды.

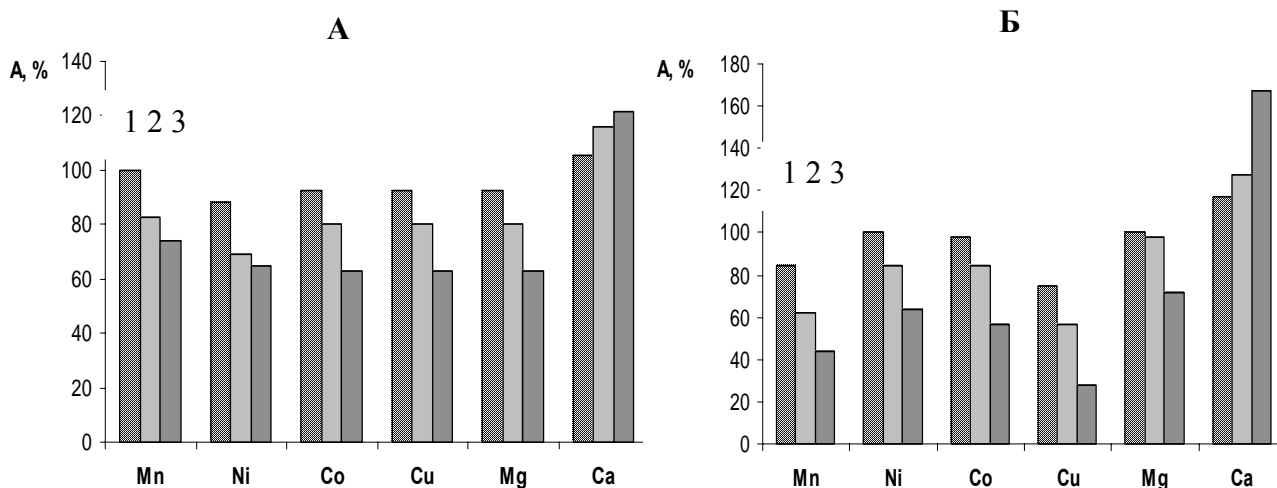


Рис. 6. Влияние ионов металлов на активность субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis*

За 100% принята активность в отсутствие ионов металлов.

А – ранняя протеиназа, Б – поздняя протеиназа;

1 – 5 мМ, 2 – 10 мМ, 3 – 20 мМ.



Ранняя и поздняя субтилизиноподобные протеиназы являются продуктами одного гена, механизм регуляции экспрессии которого различается на разных стадиях роста бактерий [Sharipova et al., 2007]. Мы предполагаем, что разное влияние ионов кальция на активность ранней и поздней протеиназы AprVi связано с особенностями белковой глобулы, что в свою очередь, может отражать изменения в физиологии бактерий. Секреция ранней протеиназы соответствует ранним стадиям споруляции бактериальной культуры, когда потребность в кальции не столь велика, как для поздней стационарной фазы, когда  $\text{Ca}^{2+}$  активно транспортируется внутрь клетки для образования зрелых спор [Errington et al., 1993].

Одним из способов стабилизации белковой глобулы является образование димерных форм. Димерные формы белков описаны для внутриклеточных субтилизинов *B. subtilis*, *B. licheniformis* и *B. amyloliquefaciens* [Strongin et al., 1979; Strongin et al., 1979; Strongin and Stepanov, 1981; Kurotsu et al., 1982; Koide et al., 1986]. Показано, что они нуждаются в кальции для поддержания активности и стабильности.

Гель-фильтрация на сефадексе G-100 препаратов протеиназы, показала, что при проведении гель-фильтрации ранняя протеиназа элюируется единственным пиком, которому соответствует белок с молекулярной массой 27 кДа (рис. 7). Гомогенный препарат позднего белка элюировался с образованием двух протеолитических пиков с молекулярными массами 27 и 54 кДа, каждый из которых обладал специфической протеолитической активностью. Это позволило нам предположить образование димерной формы белка. Таким образом, обнаруженные нами изменения в каталитических константах могут быть связаны с образованием димерной формы протеиназы AprVi, соответствующей поздней стадии роста бацилл.

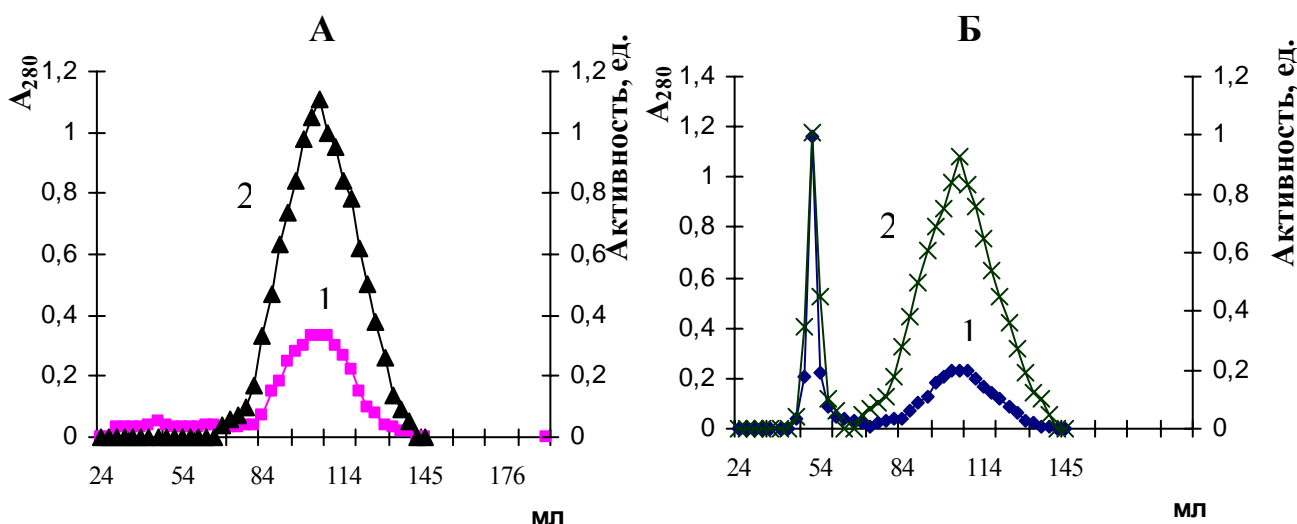


Рис. 7. Гель-фильтрация субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* рекомбинантного штамма *B. subtilis* на Сефадексе G-100.

А – ранняя протеиназа, Б – поздняя протеиназа;  
1 – количество белка, 2 – активность.

Для выяснения природы образования димерных форм протеиназы AprVi проводили электрофорез раннего и позднего белка в неденатурирующих условиях. Электрофорез в неденатурирующих условиях показал присутствие только одной полосы для обоих препаратов протеиназы (рис. 8). Мы предположили, что формирование димерной формы поздней протеиназы, выявленное с помощью гель-фильтрации, связано с электростатическим взаимодействием между мономерными формами, которое может осуществляться за счет ионов кальция.

Нами установлено, что увеличение концентрации ионов кальция в реакционной смеси приводило к активации поздней протеиназы в большей степени, чем ранней. Для выяснения роли ионов кальция в формировании димеров мы провели исчерпывающий диализ препаратов фермента против буфера, содержащего ЭДТА. Препараты ранней и поздней протеиназы после диализа против буферного раствора с ЭДТА, были подвергнуты гель-фильтрации на сефадексе G-100.

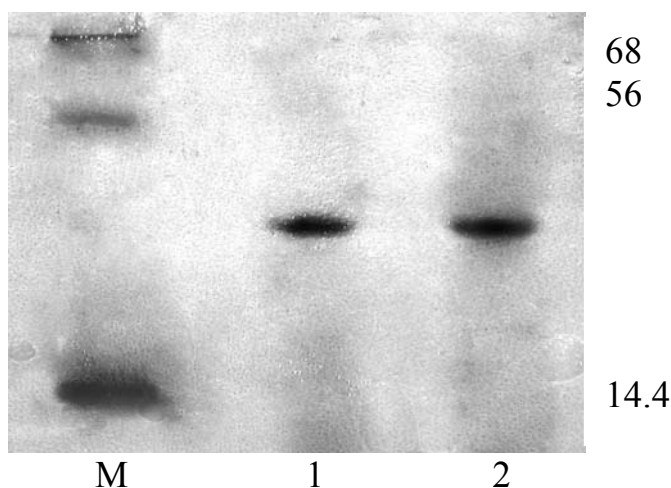


Рис. 8. Электрофорез субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* рекомбинантного штамма *B. subtilis* в нативных условиях.

1 – ранняя протеиназа, 2 – поздняя протеиназа,

М – маркеры: лизоцим (14,4 кДа), фосфатаза (56 кДа), гемоглобин (68 кДа).

Как видно из рис. 9, оба препарата протеиназы элюировались с образованием одного пика, соответствующего молекулярной массе 27 кДа. Лишенная ионов кальция поздняя протеиназа AprVi не только не образует димеров, но и полностью теряет каталитическую активность (рис. 9Б). Активность ранней протеиназы снижалась на 70% по сравнению с активностью белка в присутствии ионов кальция (рис. 9А и 7А). Следовательно, ионы кальция могут образовывать связи между двумя белковыми глобулами и быть основой для формирования димерных структур. Утрата кальция в кальций-связывающих сайтах димерных структур приводит к дестабилизации димерной фермента. В этом случае, лишенная ионов кальция молекула теряет и каталитическую активность.

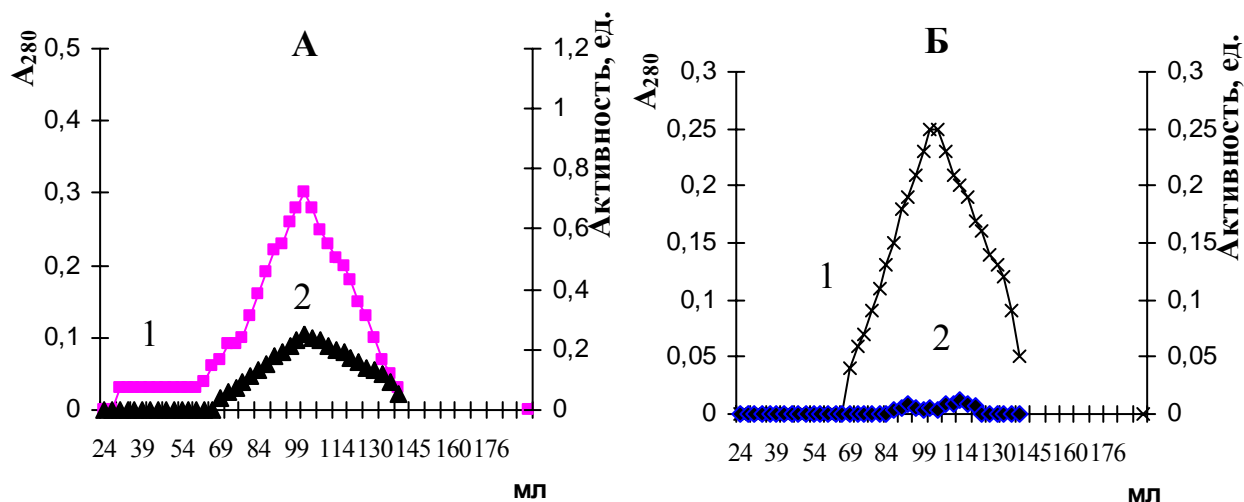


Рис. 9. Гель-фильтрация обессоленной субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* рекомбинантного штамма *B. subtilis*.

А – ранняя протеиназа, Б – поздняя протеиназа;

1 – количество белка, 2 – активность.

Итак, мы предполагаем, что различие каталитических и энзиматических свойств ранней и поздней протеиназы AprVi обусловлено формированием димерных форм. С физиологической точки зрения, димеризация может рассматриваться как особенность фермента, фолдинг которого происходит при лимитации по ионам кальция, которые активно поглощаются клеткой в условиях созревания эндоспор. По-видимому, такая структура белка обеспечивает более высокий уровень протеолитической активности фермента.

С помощью программ SwissProt и YASARA нами построена модель третичной структуры протеиназы AprVi на основании аминокислотной последовательности. Каталитическая триада активного центра протеиназы AprVi включает в себя близко расположенные остатки Asp32, His64 и Ser221 (рис. 10). Такая ориентация активного центра присуща большинству субтилизинов бактерий.

Стабильность многих субтилаз поддерживается благодаря Ca-связывающим сайтам на поверхности молекулы белка [Betz et al., 1988]. В модели протеиназы AprVi идентифицированы два Ca-связывающих, что укладывается в рамки существующих представлений о структуре субтилизинов. Из двух сайтов один относится к «сильным» сайтам связывания. Он образован 2, 41 и 76-81 аминокислотными остатками в Ca-содержащей петле. Эти аминокислотные остатки, как правило, Asp/Asn, иногда Glu/Gln [Siezen, Leunissen, 1997]. У протеиназы AprVi сайт формируют аминокислотные остатки Asp76, Asn77, Gln2, Asp41. Положение других сайтов связывания кальция у субтилаз не консервативно. Второй кальций-связывающий сайт протеиназы AprVi, по-видимому, относится к числу «слабых» сайтов связывания. Кальций-связывающие сайты протеиназы

*B. intermedius*, по-видимому, играют ведущую роль в формировании димерных структур и стабилизации белковой глобулы.

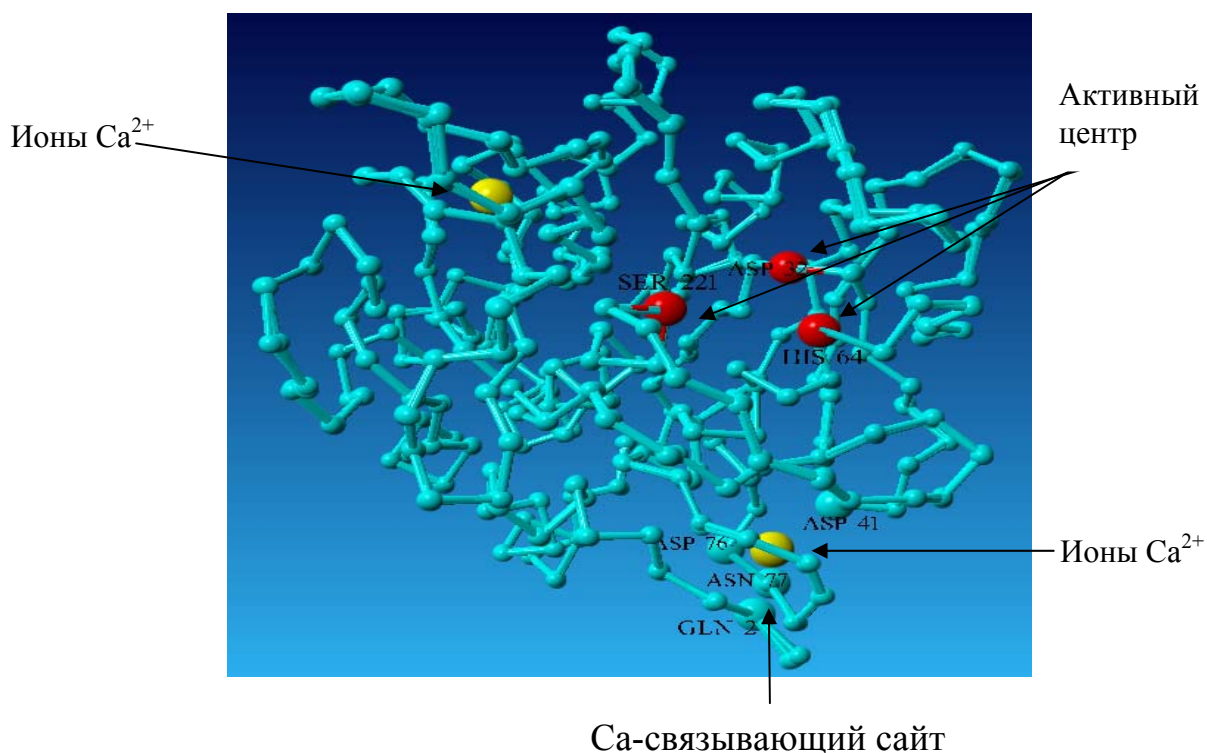


Рис. 10. Модель третичной структуры протеиназы ArgVi

Таким образом, субтилизиноподобная сериновая протеиназа *B. inremedius* секретируется в раннюю и позднюю стационарную фазу роста рекомбинантного штамма *B. subtilis*. Гомогенные препараты фермента, соответствующие 28 (ранняя протеиназа) и 48 (поздняя протеиназа) ч роста бактерий характеризуются идентичным аминокислотным составом, их N- и C- концы совпадают. Биохимические свойства обеих протеиназ отличаются по энзиматическим свойствам, а также кинетическим параметрам. Подобные отличия, вероятно, связаны с образованием Ca-зависимых димерных форм белка. Различия в структуре протеиназы разных фаз роста бактерий могут быть связаны с изменением в физиологическом состоянии культуры и, в частности, с изменениями в обмене кальция между бактериальной клеткой и средой. Проведенное впервые сравнительное изучение свойств белка, экспрессия которого происходит в течение всей стационарной фазы, включая споруляцию, показало, что поздняя протеиназа, в отличие, от ранней способна образовывать димеры в растворах. В период поздней стационарной фазы роста бактерий ионы кальция активно поглощаются клеткой с целью образования хелата дипиколиновой кислоты и кальция [Errington, 1993]. В этих условиях жизнедеятельности происходит димеризация поздней протеиназы. Такая особенность позднего белка обеспечивает выполнение протеиназой разнообразных функций, в том числе в период клеточной дифференцировки на этапе освобождения эндоспор. Формирование такой структуры может служить специфическим механизмом, выработанным

клеткой в процессе эволюции для повышения специфичности белка обеспечения его устойчивости к неблагоприятным условиям среды.

## ВЫВОДЫ

1. Подобран состав питательной среды, обеспечивающий высокий уровень активности ранней (28 ч роста) и поздней (48 ч роста) протеиназы *Bacillus intermedius* в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis*.
2. Из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* выделена субтилизиноподобная протеиназа *Bacillus intermedius*, соответствующая разным часам роста, со степенью очистки, составляющей 711 для ранней и 745 – для поздней протеиназы и выходом по активности 9,6 и 16,4%, соответственно.
3. Методом масс-спектрометрии установлено, что ранняя и поздняя протеиназа AprVi имеют идентичную последовательность аминокислот, их N- и C- концы совпадают.
4. Выявлены различия в каталитических свойствах протеиназы AprVi, секретируемой в раннюю и позднюю стационарную фазу роста.
5. Установлено, что поздний фермент образует димеры, в формировании которых участвуют ионы кальция.

## Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Кириллова Ю.М. Условия роста культуры и биосинтеза субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* / Ю.М. Кириллова, **Е.О. Михайлова**, А.М. Марданова, Н.П. Балабан, А.Р. Каюмов, Г.Н. Руденская, С.В. Костров, М.Р. Шарипова // Микробиология. – 2006. – Т.73. – № 2. – С. 1-7.
2. Кириллова Ю.М. Особенности биосинтеза субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* / Ю.М. Кириллова, **Е.О. Михайлова**, А.М. Марданова, Н.П. Балабан, Г.Н. Руденская, С.В. Костров, М.Р. Шарипова // Микробиология. – 2006. – Т.73. – № 2. – С. 8-14.
3. **Михайлова Е.О.** Выделение и характеристика субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* AJ73 на разных фазах роста бацилл / Е.О. Михайлова, А.М. Марданова, Н.П. Балабан, Г.Н. Руденская, М.Р. Шарипова // Биохимия. – 2007. – Т.72. – № 2. – С. 228 – 235.
4. **Михайлова Е.О.** Стабильность субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius* / Е.О. Михайлова, М.Р. Каримова, М.Р. Шарипова // Ученые записки Казанского государственного университета, сер. «Естественные науки». – 2007. – Т.149. – № 2. – С.105-114.
5. **Михайлова Е.О.** Влияние  $d_1$  – факторов на рост культуры и продукцию субтилизина рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* / Е.О. Михайлова, Л.А. Маликова, Н.В. Феоктистова, А.М. Марданова // «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии», Труды молодых ученых. – Казань, 2004. – С. 124-128.
6. Кириллова Ю.М. Биосинтез субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* рекомбинантным штаммом *B. subtilis* / Ю.М. Кириллова, **Е.О. Михайлова**, М.Р. Шарипова // Материалы 9-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2005. – С. 203.
7. Кириллова Ю.М. Закономерности биосинтеза протеиназы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* AJ73 / Ю.М. Кириллова, **Е.О. Михайлова**, А.Р. Каюмов, М.Р. Шарипова // Материалы XIII международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение». – Казань, 2005. – С. 44-45.
8. **Михайлова Е.О.** Особенности биосинтеза субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* в рекомбинантном штамме *Bacillus subtilis* / Е.О. Михайлова, Ю.М. Кириллова, М.Р. Шарипова // Материалы V республиканской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Наука. Инновации. Бизнес». – Казань, 2005. – С. 72-73.

9. Кириллова Ю.М. Биосинтез субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B.intermedius* рекомбинантным штаммом *B. subtilis* AJ73 / Ю.М. Кириллова, **Е.О. Михайлова**, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Материалы V научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов НОЦ КГУ «Материалы и технологии XXI века». – Казань, 2005. – С. 51.
10. **Михайлова Е.О.** Биосинтез субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B.intermedius* рекомбинантным штаммом *B. subtilis* AJ73 / Е.О. Михайлова, Ю.М. Кириллова, М.Р. Шарипова // Материалы Молодежной школы конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии». – Москва, 2005. – С. 97-98.
11. Байрамов Р.А. Биосинтез внеклеточных сериновых протеиназ *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* / Р.А. Байрамов, **Е.О. Михайлова**, А.Р. Сабирова, Ю.М. Кириллова // Материалы XLIII международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». – Новосибирск, 2005. – С. 89-90.
12. Kayumov A.R. The prediction of regulation of subtilisin-like proteinase gene from *Bacillus intermedius* through its regulatory sequence analysis / A.R. Kayumov, J.M. Kirillova, **Е.О. Mikhailova**, N.P. Balaban, M.R. Sharipova // BGRS-2006: Proceedings of the fifth international conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure. – Novosibirsk, 2006. – P. 65-69.
13. Каримова М.Р. Характеристика субтилизиноподобных протеиназ *Bacillus intermedius*, секретируемых рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* AJ 73 / **Е.О. Михайлова**, М.Р. Каримова, М.Р. Шарипова // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006». – Москва, 2006. – С. 108.
14. **Михайлова Е.О.** Субтилизиноподобные протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемые рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* / Е.О. Михайлова, М.Р. Каримова, Г.Н. Руденская, М.Р. Шарипова // Материалы 10-й международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2006. – С. 71.
15. Каримова М.Р. Выделение и некоторые свойства субтилизиноподобных протеиназ *Bacillus intermedius*, секретируемых рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* AJ73 / М.Р. Каримова, **Е.О. Михайлова**, М.Р. Шарипова // Материалы VI научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов НОЦ КГУ «Материалы и технологии XXI века». – Казань, 2006. – С. 55.
16. **Михайлова Е.О.**, Каримова М.Р., Шарипова М.Р. Характеристика субтилизиноподобных протеиназ *Bacillus intermedius*, секретируемых рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* AJ73 / Е.О. Михайлова, М.Р. Каримова, М.Р. Шарипова // Материалы VI научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов НОЦ КГУ «Материалы и технологии XXI века». – Казань, 2006. – С. 78.

17. **Михайлова Е.О.** Субтилизиноподобная протеиназа *Bacillus intermedius*, секретируемая рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* / Е.О. Михайлова, Г.Н. Руденская, М.Р. Шарипова // Тезисы докладов VI Симпозиума «Химия протеолитических ферментов». – Москва, 2007. – С. 69-70.
18. **Михайлова Е.О.** Субтилизиноподобная протеиназа *Bacillus intermedius*: физико-химические свойства / Е.О. Михайлова, О.В. Митрофанова, К.П. Федорова, М.Р. Шарипова // Материалы VII научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов НОЦ КГУ «Материалы и технологии XXI века». – Казань, 2007. – С. 78.
19. **Михайлова Е.О.** Субтилизиноподобная протеиназа *Bacillus intermedius*, секретируемая рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* AJ73: физико-химические свойства / Е.О. Михайлова, М.Р. Каримова, М.Р. Шарипова // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2007». – Москва, 2007. – С. 27-28.

Соискатель

Михайлова Е.О.

Заказ \_\_\_\_\_

Тираж 100 экз.

Офсетная лаборатория  
Казанского государственного технологического университета